

西花蓟马取食对菜豆防御基因表达的诱导作用

从春蕾, 郅军锐*, 谢路飞, 牟 峰

(贵州大学昆虫研究所, 贵州山地农业病虫害重点实验室, 贵阳 550025)

摘要: 为探讨菜豆对西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 取食的防御反应分子机制, 本实验利用荧光定量 PCR (RT-qPCR) 研究了西花蓟马取食、机械损伤及外源水杨酸甲酯 (MeSA) 和茉莉酸 (JA) 处理对菜豆叶片防御相关基因 (*LOX*, *AOS*, *PAL* 及 *PR-2*) 相对表达量的影响。结果表明: 脂氧合酶基因 (*LOX*) 的相对表达量在外源 JA 和机械损伤诱导后分别在 24 h 和 48 h 时达到最大值, 但与对照相比差异不显著 ($P > 0.05$), 外源 MeSA 处理后 *LOX* 几乎没有表达, 西花蓟马取食后 *LOX* 的相对表达量在 24 h 显著升高, 约为对照的 41.9 倍, 且明显高于其余 3 个处理 ($P < 0.05$)。不同诱导处理后丙二烯氧化物合成酶基因 (*AOS*) 的相对表达量较低, 其中外源 MeSA 处理后在整个诱导时间内几乎没有表达。苯丙氨酸解氨酶基因 (*PAL*) 在机械损伤和外源 JA 处理后在整个诱导时间内几乎没有表达, 外源 MeSA 处理后 *PAL* 的表达量在 24 h 时最高, 为对照的 1.9 倍左右。*PAL* 的相对表达量在遭受蓟马取食诱导后迅速升高, 在 24 h 时约为 CK 的 4.3 倍, 显著高于其他 3 种处理诱导的 ($P < 0.05$)。 β -1, 3-葡聚糖酶基因 (*PR-2*) 的相对表达量在蓟马取食和外源 JA 处理的整个诱导时间内受到抑制, 机械损伤诱导后 *PR-2* 的表达水平在 24 h 时有所升高, 之后诱导期间内受到抑制。外源 MeSA 诱导后菜豆叶片中 *PR-2* 的相对表达量在 24 h 就急剧升高, 达到对照的 6.63 倍, 且显著高于其余 3 种处理诱导的 ($P < 0.05$), 但 48 h 后却几乎检测不到。研究结果提示, 西花蓟马取食不仅能够诱导 SA 和 JA 介导的信号传导途径, 且两通路间存在交互作用。

关键词: 西花蓟马; 菜豆; 取食; 防御基因; 基因表达差异

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2013)10-1174-07

Expression of some defense enzyme genes in kidney bean leaves fed by *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae)

CONG Chun-Lei, ZHI Jun-Rui*, XIE Lu-Fei, MOU Feng (Guizhou Key Laboratory for Agricultural Pest Management of Mountainous Region, Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: In order to investigate the molecular mechanisms of defense responses of kidney bean to feeding of the western flower thrips (WFT), *Frankliniella occidentalis* (Pergande), the expression of defense enzyme genes (*LOX*, *AOS*, *PAL* and *PR-2*) in kidney bean leaves induced by WFT feeding, mechanical damage, exogenous methyl salicylate (MeSA), and exogenous jasmonic acid (JA), respectively, were detected by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). The results showed that the expression level of lipoxygenase gene (*LOX*) reached the peak at 24 h after JA induction and at 48 h after mechanical damage, respectively, but was not significantly different from the controls ($P > 0.05$). *LOX* was hardly expressed after kidney bean leaves were treated by MeSA. The relative expression level of *LOX* was about 41.9 times as high as that of the control at 24 h after WFT feeding and was significantly higher than that in other three treatments ($P < 0.05$). The allene oxide synthase gene (*AOS*) was expressed at a relatively lower level in different treatments and was barely expressed in the entire time of MeSA induction. The phenylalanine ammonia-lyase gene (*PAL*) was scarcely expressed during the induction of mechanical damage and JA, and reached the maximum, and its expression was 1.9 times as high as that of the control at 24 h after MeSA treatment. The expression level of *PAL* rose rapidly after WFT feeding, and was about 4.3 times as high as that of the control at 24 h, significantly higher than in other three treatments ($P < 0.05$). The expression of β -1,3-glucanase gene (*PR-2*) was suppressed during the induction of WFT feeding and JA. The expression level of *PR-2* increased at 24 h after

基金项目: 国家自然科学基金项目(31160367, 31060244)

作者简介: 从春蕾, 女, 山东临沂人, 1985年生, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生态学, E-mail: congchunlei@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhijunrui@126.com

收稿日期 Received: 2013-07-09; 接受日期 Accepted: 2013-09-18

mechanical damage and then decreased during the induction. The expression level of *PR-2* dramatically increased in 24 h after MeSA induction, and was nearly 6.63 times as high as that of the control, significantly higher than that in other three treatments ($P < 0.05$), but hardly expressed after 48 h. The findings suggest that WFT feeding could induce the SA- and JA- mediated signal transduction pathways and there are crosstalks between them.

Key words: *Frankliniella occidentalis*; kidney bean; feeding; defense genes; gene differential expression

植物在环境中受到很多种非生物和生物因子的胁迫, 昆虫取食植物会引起植物在生理生化及分子水平上发生一个极其复杂的防御反应, 而寄主植物防御反应在分子水平上则主要表现在防御基因的特异性表达上。赵丽艳(2006)研究发现蚜虫取食小麦后其防御信号传导途径的防御基因(法尼烯基合成酶基因 *FPS*、苯丙氨酸解氨酶基因 *PAL*、丙二烯氧化物合成酶基因 *AOS*) 在转录水平上的表达量与对照相比明显升高。Arimura 等(2005)研究表明二斑叶螨的取食激发了利马豆叶片中 6 种防御基因(*PR-2*, *PR-3*, *PR-4*, *LOX*, *PAL* 和 *FPS*) 转录水平的升高。大量研究表明, 使用外源信号物质如茉莉酸(JA)、茉莉酸甲酯(MeJA)、水杨酸(SA)及水杨酸甲酯(MeSA)等处理植物可启动其防御反应(徐伟和严善春, 2005; 苗进等, 2007; 冯远娇等, 2007; 刘艳艳和萧凤回, 2010), 且昆虫取食后其防御基因的表达变化情况与 JA 或 MeSA 单独处理具有相似性。

目前有研究表明, 植物对昆虫取食为害的防御途径主要包括 JA 和 SA 介导的 2 种信号传导途径(Ryan, 1990)。JA 信号途径主要调控植食性昆虫取食或抑制植食性昆虫发育的次生代谢物质和防御蛋白的产生(Chen *et al.*, 2005)。JA 合成途径的关键酶是脂氧合酶(LOX)和丙二烯氧化物合成酶(AOS)(Farmer *et al.*, 1998; Schaller, 2001), 也有研究表明外源 JA 可以激活 JA 的自身合成(Gessler *et al.*, 2012)。SA 途径则以 SA 作为主要的信号化合物(van Poecke and Dicke, 2002), 其合成途径的关键酶是苯丙氨酸解氨酶(PAL)(Dixon *et al.*, 2002), 而 β -1,3-葡聚糖酶(PR-2)是 SA 合成途径的下游产物。一般 JA 信号通路涉及抗虫反应, 而 SA 通路则与抗病有关, JA 和 SA 通路之间的交互作用在防御反应的微调中起重要作用(刘艳艳和萧凤回, 2010)。

昆虫取食不同寄主植物会产生不同的特异性转录反应, 因此相同害虫危害不同植物基因的表达差异不同, 说明基因的表达差异存在种属专一性

(Voelckel and Baldwin, 2004; De Vos *et al.*, 2005)。而不同为害方式的昆虫危害相同植物后, 基因的表达差异也不相同(Stout *et al.*, 1999; Walling, 2000)。如刺吸式口器的粉虱为害后, 会诱导寄主产生病程相关蛋白基因、木质素及 SA 生物合成相关基因、氧化酶基因的表达水平上升(Mayer *et al.*, 2002)。绿盲蝽取食既可激活 SA 介导的防御信号转导途径, 也可激活 JA 介导的信号转导途径(毛红等, 2012)。咀嚼式口器昆虫取食植物后, 会造成较大的伤口, 植物组织会遭到明显损伤, 主要激活 JA 防御信号转导途径(Alborn *et al.*, 1997)。

西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande) 是重要的世界性入侵有害生物, 对很多国家的农业生产造成了极大的危害(Kirk and Terry, 2003; 吴青军等, 2005)。蓟马属于锉吸式口器, 其取食为害植物后抗性基因表达可能和其他口器类型的昆虫不同, 但有关蓟马取食为害后寄主抗性基因的相关报道较少, 西花蓟马取食拟南芥后可诱导寄主植物防御反应的 JA, JA/ET 和 SA 3 个信号转导途径(Abe *et al.*, 2008)。本研究对西花蓟马取食、机械损伤、外源 JA 和 MeSA 诱导处理后, 不同诱导时间下菜豆 *Phaseolus vulgaris* L. 植株中主要防御途径的相关基因(*LOX*, *AOS*, *PAL* 及 *PR-2*) 进行转录水平上的定量分析, 探讨植物在应对不同胁迫时所启动的防御系统的分子机制, 对研究依靠植物自身防御系统的害虫治理策略具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫和供试植物

西花蓟马: 采自贵阳市白云区玫瑰园切花月季上, 并于实验室内利用菜豆饲养。在条件为温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度 $70\% \pm 1\%$, 光周期 14L: 10D 的人工气候箱中饲养, 繁殖 3 代以上用于实验。

菜豆植株: 在相同条件下的人工气候箱内培养菜豆植株(紫花芸豆), 以营养钵单株培育清洁苗, 待菜豆长至四真叶期时作为供试寄主植物, 生长期

间不使用任何农药。

1.2 植物的诱导处理

设置如下 4 个不同的处理：

(1)西花蓟马取食(damage by thrips feeding)诱导，记为 DTF：每个植株接 20 头西花蓟马的 1 龄若虫，将菜豆植株置于一封闭容器中。西花蓟马稳定取食 2 h 后开始计时，此时定为 0 h。取样前用毛笔把西花蓟马扫走。

(2)机械损伤(mechanical damage)，记为 MD：用消过毒的针头在健康未受伤的菜豆叶片上刺 5 次以造成机械损伤。

(3)外源茉莉酸(jasmonic acid)诱导，记为 JA：茉莉酸购自 Sigma 公司，用蒸馏水配成浓度为 1.0 mmol/L 的母液溶液(含 2.2% 乙醇，0.05% Tween-20)。以 0.1 mmol/L 的茉莉酸叶面喷施菜豆叶片，每株植株喷洒 2 mL。

(4)外源水杨酸甲酯(methyl salicylate)诱导，记为 MeSA：水杨酸甲酯购自 Sigma 公司，用蒸馏水配制浓度为 0.03 mg/L 水杨酸甲酯溶液。将带有 0.03 mg/L MeSA 的棉球放入盛有健康植株的封闭容器中。

每种处理盆栽菜豆均分别置于不同的封闭玻璃容器中，分别在 24，48，72 和 96 h 取样。以健康的未受伤的菜豆植株作为对照，记为 CK，取样时间同上。取样后放入 -80℃ 冰箱保存备用，每个处理

重复 3 次，每次重复使用一株菜豆植株，实验中所有的菜豆植株都处于相同的生理状态。

1.3 总 RNA 提取

菜豆叶片总 RNA 的提取采用 TRIzol Reagent (Invitrogen)，按照操作说明进行提取。实验中各处理和对照的叶片总 RNA，用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，用紫外分光光度计检测 RNA 的纯度及浓度。

1.4 cDNA 合成

按照 RevertAid First-Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒(Fermentas) 的操作方法，将以上各处理时间点的菜豆叶片总 RNA 进行反转录合成第一链 cDNA。获得的 cDNA 产物直接用于 PCR 或 -80℃ 贮藏备用。

1.5 防御基因荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)采用 20 μL 反应体系，按照 iTaqUniversal SYBR GreenSupermix 试剂盒进行操作。各反应成分的含量为加入 10.0 μL iTaqUniversal SYBR GreenSupermix (2 ×)，正向和反向引物各 0.5 μL，合成的 cDNA 1 μL 为模板，加水至 20 μL，混匀，微离心，放入 PCR 仪扩增。RT-qPCR 反应程序为：94℃ 预变性 2 min，94℃ 变性 20 s，60℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 40 s，40 次循环。反应中设置空白对照，分别使用 DNA 和水为模板，每个样品重复 3 次。反应结束后分析荧光值变化曲线。荧光定量引物见表 1，由上海生工合成。

表 1 RT-qPCR 反应中所使用的基因及其特异引物
Table 1 Genes and specific primers used in RT-qPCR

| 基因 Gene | GenBank 登录号 GenBank accession number | 引物序列(5' - 3') Primer sequence | 大小(bp) Size |
|----------------|---|--|----------------|
| <i>β-actin</i> | EU369188.1 | F: gaagttctcttccaccatcc R: gggecttgcctatctgtcgcg | 175 |
| <i>AOS</i> | EX303759.1 | F: tcttcgacacctccaaggtc R: gggtcgaggtaggagaggac | 103 |
| <i>LOX</i> | AF234983.1 | F: atggtggtgaccattggact R: ttagctggcccagttctgt | 140 |
| <i>PAL</i> | M11939.1 | F: ccgtgaatgacaacctctt R: gctcgagaattgagcaaac | 150 |
| <i>PR-2</i> | DQ093563.1 | F: tgagtctctgttgagggttcc R: ccttgtgatggagggttagga | 171 |

1.6 数据处理与分析

本实验采用相对定量法，以管家基因作为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法(Livak and Schmittgen, 2001)对

防御基因进行定量分析。计算公式如下：目的基因相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ，其中 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{实验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{对照组}$ 。利用

Origin8.0 对数据进行分析 and 绘图, 采用 SPSS18.0 软件 Duncan 氏新复极差法检验各处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 不同处理对菜豆脂氧合酶基因 *LOX* 相对表达量的影响

不同诱导处理后菜豆叶片内 *LOX* 的相对表达量在不同处理和不同时间下是不同的(图 1)。*LOX* 的相对表达量在蓟马取食处理后显著升高, 于 24 h 达到表达高峰, 约为 CK 的 41.9 倍, 随后表达量降低, 为害至 96 h 时仅约为对照的 1/3; 机械损伤诱导 *LOX* 的相对表达量在诱导前期缓慢升高, 至 48 h 达到最大值, 且显著高于对照, 约为对照的 8.9 倍, 诱导后期的表达量降低至约为对照的 1/2; 外源 JA 诱导处理后, *LOX* 的相对表达量在 24 h 时升高至对照水平的 10.9 倍, 但与对照相比差异不显著($P > 0.05$), 48 h 相对表达量下降至对照的 2.5 倍, 诱导后期(72–96 h) *LOX* 均无明显表达; 而外源 MeSA 处理后 *LOX* 在整个诱导期间内均无明显表达。

在诱导至 24 h, 蓟马取食诱导的 *LOX* 的相对表达量显著高于其余 3 种处理的; 诱导至 48 h, 机械损伤诱导处理后 *LOX* 的相对表达量与蓟马取食诱导的无明显差异, 均显著高于外源激素诱导的($P < 0.05$), 诱导后期(72–96 h)各处理间相对表达量均无明显变化。

2.2 不同处理对菜豆丙二烯氧化物合成酶基因 *AOS* 相对表达量的影响

西花蓟马取食、机械损伤、外源 JA 和 MeSA 处理后丙二烯氧化物合成酶基因 *AOS* 的相对表达量发生了不同程度的变化(图 2)。蓟马取食诱导 24 h, *AOS* 的相对表达量约为 CK 的 1.8 倍, 随后逐步降低, 至 96 h 几乎检测不到 *AOS* 的表达; *AOS* 的相对表达量在机械损伤诱导处理后 24 h 为对照的 2 倍左右, 而在 48 h 后开始下降, 且其表达量受到抑制; 外源 JA 处理后相对表达量在 24 h 迅速升高, 约为对照的 1.7 倍, 48–72 h 诱导时间内相对表达量受到抑制, 96 h 又升高至对照水平; 外源 MeSA 处理后 *AOS* 的表达量受到了强烈的抑制, 在整个检测时间内几乎没有表达。

诱导处理 24, 48 及 96 h, 各处理间无显著性差异; 而在 72 h, 机械损伤、蓟马取食诱导的与对照相比均无显著性差异, 但都高于外源 JA 和 MeSA 诱导的表达量。

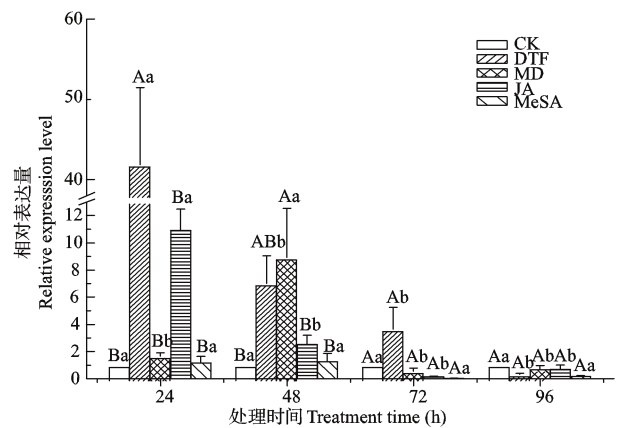


图 1 不同处理对菜豆脂氧合酶基因 *LOX* 相对表达量的影响

Fig. 1 Effects of different treatments on the expression of *LOX* in kidney bean leaves

CK: 健康植株 Healthy kidney bean; DTF: 西花蓟马取食 Damage by thrips' feeding; MD: 机械损伤 Mechanical damage. 图中数据为平均值 \pm 标准误, 柱上不同大写字母表示不同处理在相同处理时间下在 $P < 0.05$ 水平上差异显著, 不同小写字母表示同一处理在不同处理时间下在 $P < 0.05$ 水平上差异显著 (Duncan 氏新复极差法)。下图同。Data in the figure are expressed as mean \pm SE. Different capital letters above bars indicate significant differences at the 0.05 level among different treatments during the same treatment time; different small letters indicate significant differences at the 0.05 level among different treatment time under the same treatment. The same for the following figures.

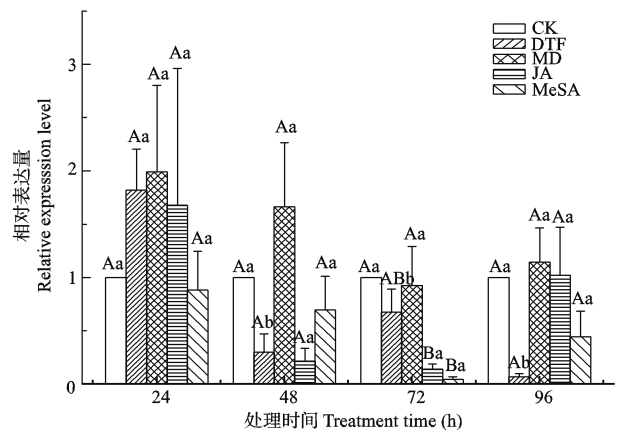


图 2 不同处理对菜豆丙二烯氧化物合成酶基因 *AOS* 相对表达量的影响

Fig. 2 Effects of different treatments on the expression of *AOS* in kidney bean leaves

2.3 不同处理对菜豆苯丙氨酸解氨酶基因 *PAL* 相对表达量的影响

不同处理后菜豆叶片内 SA 途径的关键酶苯丙氨酸解氨酶基因 *PAL* 的相对表达量均有不同程度的变化(图 3)。*PAL* 的相对表达量遭受西花蓟马取

食诱导后显著升高, 约为CK的4.3倍, 之后下降, 在48 h明显低于对照, 在72 h恢复至对照水平, 96 h又上升约为CK的1.72倍, 且显著高于对照; 机械损伤处理后 *PAL* 的相对表达量在诱导24 h仅为对照的1.37倍, 在诱导48–96 h期间 *PAL* 的相对表达量受到强烈抑制; 外源 JA 处理后基因的相对表达量在整个诱导期间受到强烈抑制; 外源 MeSA 处理24 h后 *PAL* 的相对表达量达到对照的1.9倍左右, 之后的诱导时间内均受到强烈抑制。

诱导24 h 蓟马取食处理后 *PAL* 的相对表达量显著高于对照, 且显著高于其余3个处理 ($P < 0.05$); 诱导48 h, 4个处理均受到强烈的抑制; 诱导至96 h与诱导24 h相似, 蓟马取食后 *PAL* 的相对表达量显著高于对照, 但机械损伤和外源 MeSA 诱导的基因的相对表达量显著低于对照水平。

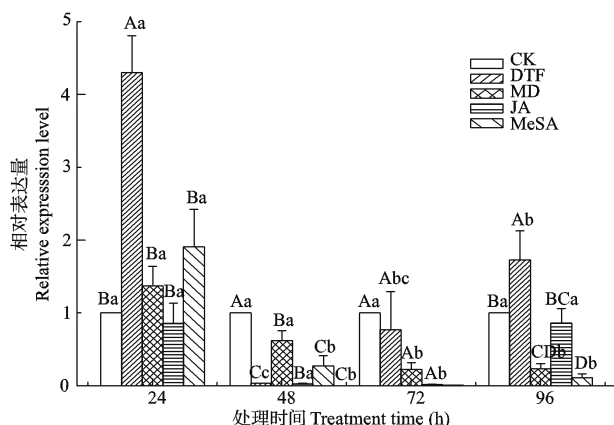


图3 不同处理对菜豆苯丙氨酸解氨酶基因 *PAL* 相对表达量的影响

Fig. 3 Effects of different treatments on the expression of *PAL* in kidney bean leaves

2.4 不同处理对菜豆 β -1,3-葡聚糖酶基因 *PR-2* 相对表达量的影响

西花蓟马取食后菜豆叶片内 SA 途径的关键酶 β -1,3-葡聚糖酶基因 *PR-2* 的相对表达量在整个诱导期间受到抑制 (图4); 机械损伤处理后 *PR-2* 的相对表达量先升高后下降, 在24 h为对照的1.37倍, 之后相对表达量呈缓慢下降的趋势, 诱导处理48 h仅为对照的1/3, 96 h机械损伤所诱导的 *PR-2* 的相对表达量几乎近于0; 外源 JA 处理后基因 *PR-2* 的相对表达量受到抑制, 在整个诱导时间内几乎没有表达; 外源 MeSA 处理后菜豆叶片 *PR-2* 的表达量的变化十分明显, 在诱导后24 h就急剧升高, 达到对照的6.63倍, 48 h以后却几乎检测不到。

不同处理诱导24 h仅外源 MeSA 诱导的 *PR-2*

的相对表达量显著高于对照, 且显著高于其余3个处理诱导的 ($P < 0.05$); 在48–72 h间4个处理均显著低于对照, 且诱导处理间差异不显著; 至96 h所有处理间差异不显著。

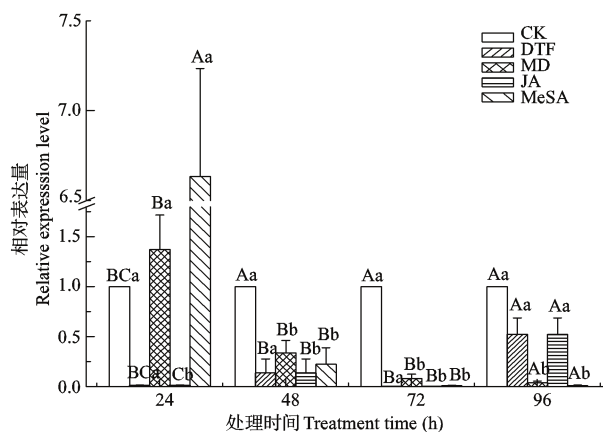


图4 不同处理对菜豆 β -1,3-葡聚糖酶基因 *PR-2* 的相对表达量的影响

Fig. 4 Effects of different treatments on the expression of *PR-2* in kidney bean leaves

3 讨论

在本研究中发现菜豆植物体内 JA 途径关键酶基因 *LOX* 和 *AOS* 及 SA 途径关键酶基因 *PAL* 和 *PR-2* 这4个防御基因在不同诱导条件和不同时间下的相对表达量均发生了不同变化。

LOX 是合成茉莉酸的关键酶, 而茉莉酸作为信号分子刺激一系列防御相关基因的表达从而启动合成一系列防御物质 (Feussner and Wasternack, 2002)。在本实验中, 菜豆植株体内的防御酶基因 *LOX* 对于西花蓟马的为害应答激烈, 在24 h时相对表达量的变化倍数最高达到对照的41.9倍, 该基因相对表达量的升高表明西花蓟马的为害启动了植物的防御反应。而机械损伤虽然也可以诱导菜豆植株 *LOX* 表达量发生变化, 但相对于蓟马取食, 机械损伤响应比较平缓, 相对表达量变化不大, 这可能是因为植物对昆虫取食为害的反应与对一般机械损伤的反应不同, 而昆虫唾液中具有某些成分可以进一步诱导和激发植物的防御反应。徐涛等 (2003) 研究发现咀嚼式口器斜纹夜蛾危害对 *LOX* 表达的诱导作用明显强于刺吸式口器褐飞虱危害的诱导作用。本研究的结果比较发现, 虽然不同处理都可以诱导 *LOX* 的表达, 但其变化趋势并不相同。在本实验中, 对菜豆植株进行外源 JA 诱导后 *LOX* 的相对表达量迅速升高至对照的10.9倍, 而外源

MeSA 诱导后 *LOX* 的相对表达量虽低于外源茉莉酸诱导的, 但也被诱导。这可能是由于外源 JA 能引起植物 JA 介导的 JA 信号转导途径, 而外源 MeSA 引起植物防御途径的 JA 信号转导途径受到 SA 的抑制造成的(Niki *et al.*, 1998)。

AOS 也是合成茉莉酸的关键酶, 但 Niki 等(1998)在拟南芥中发现, SA 能够抑制 JA 生物合成途径中 AOS 基因的表达, 也能抑制 JA 诱导的 12-OPDA 的生成。在本实验中, AOS 在受到西花蓟马取食、机械损伤和 JA 处理后相对表达量均无明显变化, 而外施 MeSA 后在整个诱导时间内相对表达量几乎为 0, 同时在研究中还发现西花蓟马取食菜豆植株后诱导的 *LOX* 相对表达量高于 AOS, 可能是由于在植物防御反应的 AOS 信号途径中, JA 信号途径通过参与活性氧途径可以诱导 SA 浓度的升高和抑制 SA 调控的病程相关蛋白来影响 O_3 诱导细胞的死亡, 这种双重作用表明 JA-途径能有差异地与 SA-途径相互作用, 调控防御反应信号的放大(Rao and Davis, 2001)。

PAL 是苯丙烷途径的关键酶和限速酶(Mauch-Mani and Slusarenko, 1996)。菜豆植株体内的 PAL 的相对表达量在西花蓟马为害后变化倍数最高达到对照的 4.3 倍, 该基因参与防御害虫危害的作用并启动 SA 防御信号系统, 但之后有一个下降后升高的过程, 这可能是由于受其末端产物病程相关蛋白的影响。有研究表明, 机械伤口损伤也可以引起 PAL 活性的升高(程水源等, 2003), 在本研究中 PAL 相对表达量对机械损伤的应急变化仅为对照的 1.37 倍, 明显低于西花蓟马取食诱导的该基因的表达量。外源信号物质 MeSA 诱导与西花蓟马取食诱导相似, 也可以增加菜豆叶片中 PAL 的表达量, 且效果更为明显。毛红等(2012)研究发现, 绿盲蝽取食、机械损伤、外源 SA 和外源 MeJA 处理后的棉叶中 PAL 表达量均升高, 且外源信号物质诱导与绿盲蝽取食诱导相似, 其结果与本研究基本一致, 但基因表达变化趋势不一致, 可能是由于绿盲蝽与西花蓟马的取食方式及取食的寄主植物不同造成的。

PR-2 在降解病原菌细胞壁、对抗病原的侵染和抑制真菌的生长过程中起着非常重要的作用, 被认为是一类重要的抗真菌蛋白(Mauch *et al.*, 1984), 且其水解产物寡糖可以作为激发因子, 诱导植物产生防御反应(Ride and Barber, 1990)。西花蓟马取食诱导的菜豆植株体内 PR-2 的相对表达量在诱导期间一直受到抑制。但有报道小麦二叉蚜

取食高粱时可激活 SA 信号依赖的病程相关基因(Zhu-Salzman *et al.*, 2004), 与本实验所得结果不同, 可能是由于小麦二叉蚜取食导致高粱感毒造成的, 也可能是不同寄主和昆虫所诱导的防御反应不同造成的。机械损伤诱导后 PR-2 表达量升高至对照的 1.37 倍, 且与 PAL 表达量的变化趋势相同, 所以该基因表达量升高可能与 PAL 表达量的变化相关。本研究还发现, 外源 MeSA 明显提高了 PR-2 的相对表达, 而外源 JA 在整个诱导期间一直受到抑制, 说明外源 JA 未能引起 SA 信号转导途径。

研究表明, 西花蓟马取食激活了菜豆 JA 及 SA 介导的信号途径, 这两条信号通路间存在相互作用。外源 JA 或者 MeSA 单独处理的与昆虫取食后防御基因的表达变化情况具有相似性。*LOX*, *AOS*, *PAL* 和 *PR-2* 这 4 个防御酶基因均是多基因家族, 且仅为多基因家族中的一个, 而防御酶的活力变化则是由多个防御酶基因共同调控的结果, 且不同成员的表达特异性也不相同, 所以应继续对多基因家族的成员进行测定。

致谢 感谢贵州大学昆虫研究所李尚伟博士对实验的指导及本文的修改。

参考文献 (References)

- Abe H, Onnishi J, Narusaka M, Seo S, Narusaka Y, Tsuda S, Kobayashi M, 2008. *Arabidopsis*-thrips system for analysis of plant response to insect feeding. *Plant Signaling & Behavior*, 3(7): 446–447.
- Alborn HT, Turlings TCJ, Jones TH, Stenhagen G, Loughrin JH, Tumlinson JH, 1997. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science*, 276(5314): 945–949.
- Arimura G, Kost C, Boland W, 2005. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochim. Biophys. Acta*, 1734(2): 91–111.
- Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DCS, 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular Cell*, 17(3): 393–403.
- Cheng SY, Chen KS, Liu WH, Du HW, 2003. Regulation and expression of the PAL in plant and its outlook. *Journal of Fruit Science*, 20(5): 351–357. [程水源, 陈昆松, 刘卫红, 杜何为, 2003. 植物苯丙氨酸解氨酶基因的表达调控与研究展望. 果树学报, 20(5): 351–357]
- De Vos M, Van Oosten VR, Van Poecke RMP, Van Pelt JA, Pozo MJ, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux J, Van Loon LC, Dicke M, 2005. Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(9): 923–937.

- Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Reddy MSS, Wang L, 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence – a genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.*, 3(5): 371–390.
- Farmer EE, Weber H, Vollenweider S, 1998. Fatty acid signaling in *Arabidopsis*. *Planta*, 206(2): 167–174.
- Feng YJ, Wang JW, Luo SM, 2007. Effects of exogenous jasmonic acid on concentrations of direct defense chemicals and expression of related genes in Bt (*Bacillus thuringiensis*) corn (*Zea mays*). *Scientia Agricultura Sinica*, 40(11): 2481–2487. [冯远娇, 王建武, 骆世明, 2007. 外源茉莉酸处理对 Bt 玉米直接防御物质含量及其相关基因表达的影响. 中国农业科学, 40(11): 2481–2487]
- Fussner I, Wasternack C, 2002. The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 275–297.
- Gessler NN, Filippovich SY, Bachurina GP, Groza NV, Dorodnikova EA, Belozerskaya TA, 2012. Effect of oxylipins on *Neurospora crassa* growth and differentiation. *Mikrobiologiya*, 81(5): 587–593.
- Kirk WDJ, Terry LI, 2003. The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Agricultural and Forest Entomology*, 5: 301–310.
- Liu YY, Xiao FH, 2010. Jasmonate and salicylate mediated plant defense responses and their application in medicinal plants. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 26(14): 98–100. [刘艳艳, 萧凤回, 2010. JAs、SAs 介导的植物防御反应及在药用植物中的应用. 中国农学通报, 26(14): 98–100]
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Mao H, Yang YH, Guo CX, Zhang QW, Liu XX, 2012. Changes in defensive enzyme activity and defensive enzyme gene expression in cotton leaves after feeding by *Apolygus lucorum*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(3): 652–659. [毛红, 杨宇晖, 郭晨茜, 张青文, 刘小侠, 2012. 绿盲蝽取食诱导后棉花叶片内防御酶活力与基因表达量的变化. 应用昆虫学报, 49(2): 652–659]
- Mauch F, Hadwiger LA, Boller T, 1984. Ethylene: symptom, not signal for the induction of chitinase and β -1, 3-PR-2 canase in pea pods by pathogens and elicitors. *Plant Physiology*, 76(3): 607–611.
- Mauch-Mani B, Slusarenko AJ, 1996. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell*, 8: 203–212.
- Mayer RT, Inbar M, McKenzie CL, Shatters R, Borowicz V, Albrecht U, Powell CA, Doostdar H, 2002. Multitrophic interactions of the silverleaf whitefly, host plants, competing herbivores, and phytopathogens. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 51(4): 151–169.
- Miao J, Li GP, Han BY, 2007. Recent developments in effect and mechanism of salicylic acid and methyl salicylate on plant resistance to pests. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 28(1): 111–114. [苗进, 李国平, 韩宝瑜, 2007. 水杨酸和水杨酸甲酯在植物抗虫中的作用及机制研究进展. 热带作物学报, 28(1): 111–114]
- Niki T, Mitsuhashi I, Seo S, Ohtsubo N, Ohashi Y, 1998. Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.*, 39(5): 500–507.
- Rao MV, Davis KR, 2001. The physiology of ozone induced cell death. *Planta*, 213(5): 682–690.
- Ride JP, Barber MS, 1990. Purification and characterization of multiple forms of endochitinase from wheat leaves. *Plant Science*, 71(2): 185–197.
- Ryan CA, 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 28(1): 425–449.
- Schaller F, 2001. Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *Journal of Experimental Botany*, 52(354): 11–23.
- Stout MJ, Fidantsef AL, Duffey SS, Bostock RM, 1999. Signal interactions in pathogen and insect attack: systemic plant-mediated interactions between pathogens and herbivores of the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 54(3–4): 115–130.
- Van Poecke RMP, Dicke M, 2002. Induced parasitoid attraction by *Arabidopsis thaliana*: involvement of the octadecanoid and the salicylic acid pathway. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1793–1799.
- Voelckel C, Baldwin IT, 2004. Generalist and specialist lepidopteran larvae elicit different transcriptional responses in *Nicotiana attenuata*, which correlate with larval FAC profiles. *Ecology Letters*, 7(9): 770–775.
- Walling LL, 2000. The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19(2): 195–216.
- Wu QJ, Zhang YJ, Xu BY, Zhu GR, 2005. The biological character, damage and management of an invasive insect pest, *Frankliniella occidentalis*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(1): 11–14. [吴青君, 张友军, 徐宝云, 朱国仁, 2005. 入侵害虫西花蓟马的生物学、危害及防治技术. 昆虫知识, 42(1): 11–14]
- Xu T, Zhou Q, Chen W, Zhang GR, He GF, Gu DX, Zhang WQ, 2003. Jasmonic acid signal transduction pathway involved in the process of rice pest induced defense. *Chinese Science Bulletin*, 48(13): 1442–1446. [徐涛, 周强, 陈威, 张古忍, 何国锋, 古德祥, 张文庆, 2003. 茉莉酸信号传导途径参与了水稻的虫害诱导防御过程. 科学通报, 48(13): 1442–1446]
- Xu W, Yan SC, 2005. The function of jasmonic acid in induced plant defence. *Acta Ecologica Sinica*, 25(8): 2074–2082. [徐伟, 严善春, 2005. 茉莉酸在植物诱导防御中的作用. 生态学报, 25(8): 2074–2082]
- Zhao LY, 2006. Research on the biochemical and molecular mechanism of induced defense responses of wheat infested by *Sitobion avenae* (Fabricius). MSc Thesis, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. [赵丽艳, 2006. 麦长管蚜取食诱导小麦防御反应的生化及分子机制. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文]
- Zhu-Salzman K, Saizman RA, Ahn JE, Koiwa H, 2004. Transcriptional regulation of sorghum defense determinants against a phloem-feeding aphid. *American Society of Plant Biologists*, 134: 1420–1431.

(责任编辑: 赵利辉)